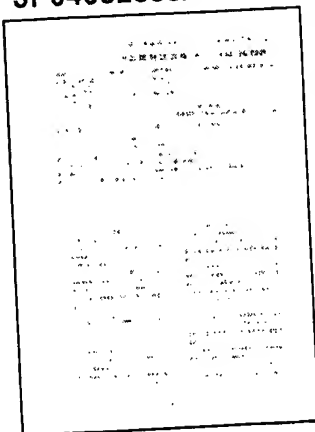


JP04082888A

**Title:****Abstract:**

PRODUCTION OF TETRAHYDROBIOPTERIN AND ENZYME USED THEREFOR

PURPOSE: To efficiently obtain the subject compound in one pot by reacting guanosine triphosphate (GTP) with GTP cyclohydrolase- pyruvoyltetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase.

CONSTITUTION: Guanosine 5'-triphosphate (GTP) is reacted with GTP cyclohydrolase 1,6-pyruvoyltetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase derived from *Escherichia coli* to afford the objective 6-(R)-L- erythro-5,6,7,8- tetrahydrobiopterin expressed by the formula.

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&Japio

**Assignee:****Inventor:****Publication Date:****Application Date:****Cites:****Cited By:****Intl Class:****SUNTORY LTD****KAGAMIYAMA HIROYUKI****HATAKEYAMA KAZUYUKI**

1992-03-16

1990-07-21

0

1

C07D47504; C12N00904; C12N00980; C12N01553; C12N01561; C12P01718

Core: C12P01718 [2006-01]; C12N01561 [2006-01]; C12N01553 [2006-01]; C12N00978 [2006-01]; C12N00904 [2006-01]; C07D47500 [2006-01]; C12N01509 [2006-01]

Adv: C12P01718 [2006-01]; C12N01561 [2006-01]; C12N01553 [2006-01]; C12N00980 [2006-01]; C12N00904 [2006-01]; C07D47504 [2006-01]; C12N01509 [2006-01]

**US Class:****Field of Search:**

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-82888

⑬ 公開 平成4年(1992)3月16日

⑭ Int.Cl.<sup>5</sup>

C 07 D 475/04  
C 12 N 9/04  
C 12 P 17/18  
// C 12 N 15/53  
15/61

識別記号

ZNA Z  
B

庁内整理番号

8829-4C  
7823-4B  
7823-4B  
8931-4B

8717-4B

C 12 N 15/00

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全 23 頁)

⑮ 発明の名称 テトラヒドロピオプテリンの製法およびそれに用いる酵素

⑯ 特 願 平2-193359

⑰ 出 願 平 2(1990)7月21日

⑱ 発 明 者 鏡 山 博 行 兵庫県西宮市甲子園口2丁目27-16  
⑱ 発 明 者 畠 山 和 幸 大阪府高槻市高槻町17-17  
⑲ 出 願 人 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
⑳ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外 4 名

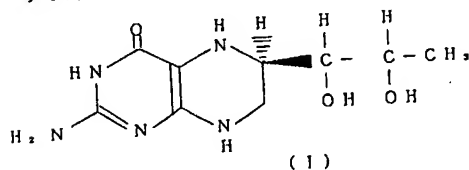
# 明細書

## 1. (発明の名称)

テトラヒドロピオプテリンの製法およびそれに用いる酵素

## 2. (特許請求の範囲)

1. グアノシン5'-三リン酸(GTP)に、大腸菌由来GTPシクロヒドロラーゼI、6-ビルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素およびセビアプテリン還元酵素を作用させることを特徴とする式(1)：



で示される6-(R)-L-エリスロー5, 6, 7, 8-テトラヒドロピオプテリンの製法。

2. 大腸菌由来GTPシクロヒドロラーゼIが、アミノ末端から25番目までのアミノ酸配列が式：

Pro-Ser-Leu-Ser-Lys-Glu-Ala-Ala-Leu-Val-  
His-Glu-Ala-Leu-Val-Ala-Arg-Gly-Leu-Glu-

Thr-Pro-Leu-Arg-Pro

で示され、GTPを特異的にD-エリスロー7, 8-ジヒドロネオプテリントリホスフェートに変換する能力を有するものである請求項1記載の製法。

3. 6-ビルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素がラット肝由来であり、アミノ末端から15番目までのアミノ酸配列が式：

Val-Gly-Ileu-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Leu-Ser-  
Arg-Leu-Val-Ser-Phe

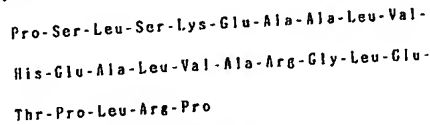
で示され、D-エリスロー7, 8-ジヒドロネオプテリントリホスフェートを特異的に6-ビルボイル5, 6, 7, 8-テトラヒドロプテリンに変換する能力を有するものである請求項1記載の製法。

4. セビアプテリン還元酵素がラット赤血球由来であり、部分アミノ酸配列：

Leu-Leu-Ser-Leu-Leu-Gln-Arg-Asp-Thr-Phe-  
Gln-Ser-Gly-Ala-His-Val-Asp-Phe-Tyr-Asp-  
Ile

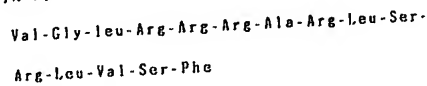
を有し、6-ビルボイル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロプテリンを特異的に6-(R)-L-エリスロー-5, 6, 7, 8-テトラヒドロビオプテリンに変換する能力を有するものである請求項1記載の製法。

5. アミノ末端から25番目までのアミノ酸配列が式：



で示され、GTPを特異的にD-エリスロー-7, 8-ジヒドロネオプテリントリホスフェートに変換する能力を有する大腸菌由来GTPシクロヒドラーゼ1。

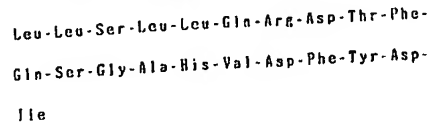
6. アミノ末端から15番目までのアミノ酸配列が式：



で示され、D-エリスロー-7, 8-ジヒドロネオプテリントリホスフェートを特異的に6-ビルボ

イル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロプテリンに変換する能力を有するラット肝由来6-ビルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素。

7. 部分アミノ酸配列：



を有し、6-ビルボイル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロプテリンを特異的に6-(R)-L-エリスロー-5, 6, 7, 8-テトラヒドロビオプテリンに変換する能力を有するものであるラット赤血球由来セビアプテリン還元酵素。

3. (発明の詳細な説明)

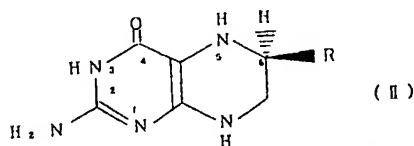
(産業上の利用分野)

本発明は、6-(R)-エリスロー-5, 6, 7, 8-テトラヒドロビオプテリン(以下、BH4とすることがある)の製法に関する。

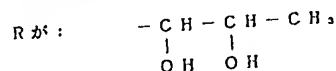
さらに詳しくは、酵素法によるBH4の製造の改良方法に関する。  
(従来の技術)

3 -

テトラヒドロビオプテリンには、例えば、その6位の炭素原子の側鎖の相対配置により、D-系列とL-系列があり、また、そのテトラヒドロ体には、6位の炭素原子における絶対配置によって(R)-または(S)-という二つのジアステレオマーが存在することが知られている。すなわち一般式(II)：



で示されるテトラヒドロプテリン誘導体において、



であるものがBH4である。

BH4は生体内に存在し、モノアミン神経伝達物質合成に関与するモノオキシゲナーゼの補酵素であり、その調節因子の一つであると考えられている。従って、BH4の欠乏は、神経伝達物質であるセロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、

アドレナリンなどの欠乏をもたらす、重篤な神経症状をもたらす。例えば、悪性フェニルケトン尿症などが知られており、事実、6-(R, S)-テトラヒドロビオプテリン投与による先駆的な治療成果も報告されている(Niedermieser, A.ら, Lancet, L, 550 (1979); Curtius, H-CHら, Clin. Chim. Acta, 98, 251-262 (1979))。

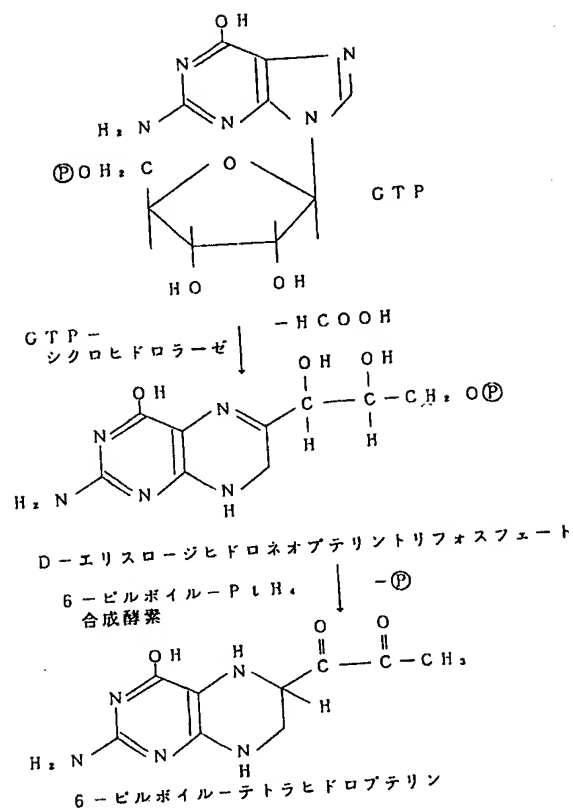
テトラヒドロビオプテリンを製造する方法としては、L-エリスロービオプテリンを化学的あるいは酵素的に還元する方法が知られている。

しかしながら、化学的方法によればビオプテリン自体の合成に費用がかかり煩雑であり、また6R体と6S体の混合物を生じ、これは分割しなければならぬが、この分割は極めて困難であり、現在その有利な分割法は知られておらず、6R体の生成収率を高める研究がなされている。一方、酵素法は6R体のみが得られるという利点はあるが、装置および操作が煩雑であるという問題がある。

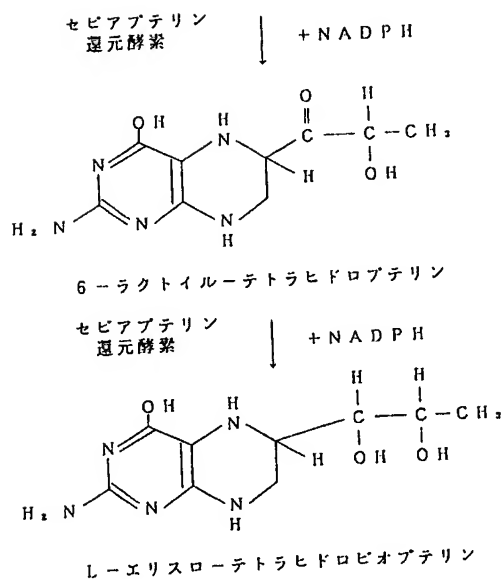
マイルシュタインらは、各種動物組織や酵母中

- 4 -

に存在するグアノシン5'-三リン酸 (GTP) を出発原料とするBH4の酵素法による方法を報告している (BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATION, 128, No.3, 1093-1107(1985)). その方法は次に示すスキームからなる。



- 8 -



- 7 -

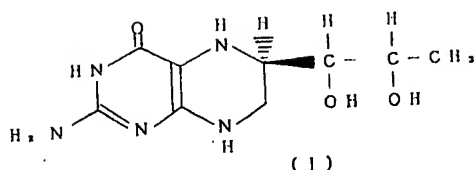
しかしながら、マイルシュタインらの方法は、上記スキームから明らかな如く、複数の反応工程からなり煩雑な操作が要求され、また中間生成物、特に6-β-リブイル-テトラヒドロプテリンは非常に不安定であり、その分離後最終反応工程に供しセビアプテリン還元酵素と反応させるのは困難であり、とても実用的方法とは言いがたい。また、すべての工程に単一精製標品の酵素を用いていないので、BH4と副産物(未同定を含む)の分離が困難となっている可能性がある。

(発明が解決しようとする課題)

そこで、本発明者らは、上記現状に鑑み鋭意研究を重ねた結果、GTPを出発原料としてBH4をワンポットで効率良く製造しうる酵素系を見出し、本発明を完成するに至った。

(課題を解決するための手段)

即ち、本発明は、GTPに大腸菌由来GTPシクロヒドラーゼ1、6-β-リブイルテトラヒドロプテリン合成酵素およびセビアプテリン還元酵素を作用させることを特徴とする式(1)：



で示される 6-(R)-L-エリスロー 5, 6, 7, 8-テトラヒドロビオプテリンの製法を提供する。

本発明は上記製法に用いる酵素、

(1) アミノ末端から 25 番目までのアミノ酸配

列が式：

Pro-Ser-Leu-Ser-Lys-Glu-Ala-Ala-Leu-Val-  
His-Glu-Ala-Leu-Val-Ala-Arg-Gly-Leu-Glu-  
Thr-Pro-Leu-Arg-Pro

で示され、GTP を特異的に D-エリスロー 7, 8-ジヒドロネオプテリントリホスフェートに変換する能力を有する大腸菌由来 GTP シクロヒドロラーゼ I、

(2) アミノ末端から 15 番目までのアミノ酸配列が式：

Val-Gly-Ileu-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Leu-Ser-

Arg-Leu-Val-Ser-Phe

で示され、D-エリスロー 7, 8-ジヒドロネオプテリントリホスフェートを特異的に 6-ビルボイル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロプロブテリンに変換する能力を有するラット肝由来 6-ビルボイルテトラヒドロプロブテリン合成酵素、および

(3) 部分アミノ酸配列が式：

Leu-Leu-Ser-Leu-Leu-Gln-Arg-Asp-Thr-Phe-  
Gln-Ser-Gly-Ala-His-Val-Asp-Phe-Tyr-Asp-  
Ile

を有し、6-ビルボイル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロプロブテリンを特異的に 6-(R)-L-エリスロー 5, 6, 7, 8-テトラヒドロビオプテリンに変換する能力を有するものであるラット赤血球由来セビアプテリン還元酵素も提供する。

本発明において出発原料として用いる GTP は、各種動物組織や酵母の酸抽出液から通常の方法に従って分離精製して得ることができる。また、市販の GTP を用いてもよい。

- 11 -

本発明の酵素系は、大腸菌由来 GTP シクロヒドロラーゼ I (以下、GCH という)、例えばラット肝から得られる 6-ビルボイルテトラヒドロプロブテリン合成酵素 (以下、PTPS という) および例えばラット赤血球から得られるセビアプテリン還元酵素 (以下、SPR という) からなる。これらの酵素は、溶液状態で混合して用いるのが好ましいが、単独または一緒に、通常の方法、例えば担体結合法や包括法により固定化されて用いられてもよい。

本発明において上記 3 種の酵素は、BH4 の生成に十分な濃度で使用すればよいが、本発明によれば、これらの酵素を全て、SDS 電気泳動または HPLC の分析でほぼ純粋な単一精製標品に精製する方法も提供される。全ての酵素を単一精製標品として用いれば、構造不明な副産物の生成を最少にすることが期待され、BH4 の分離回収も容易である。

本発明の酵素系は、GTP シクロヒドロラーゼ I (GCH) が大腸菌由来のものであることが重

- 12 -

要である。GCH を、大腸菌以外の由来、例えばラット由来の GCH で代用した場合には、該酵素が最終生成物 BH4 で阻害され (BH4 の 10  $\mu$ M で 30% 阻害される)、さらに D-エリスロー 7, 8-ジヒドロネオプテリントリホスフェートの 6-ビルボイル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロプロブテリンへの変換反応に必要な  $MgCl_2$  でも阻害される ( $MgCl_2$  の 0.1 mM で 50% 阻害) ため、該ラット由来の酵素を含む酵素系は、本発明の製造方法のごときワンポットでの反応に用いることはできない。

本発明の製法において、反応系中の GCH 濃度は好ましくは 500 ~ 5000  $\mu$ g/ml、特に好ましくは 5000  $\mu$ g/ml、PTPS 濃度は好ましくは 50 ~ 500  $\mu$ g/ml、特に好ましくは 500  $\mu$ g/ml、また SPR 濃度は好ましくは 4 ~ 40  $\mu$ g/ml、特に好ましくは 40  $\mu$ g/ml がよい。但し、ここに例示した酵素量の上限は主として酵素の精製標品における最終濃度により決定されるもので、酵素活性が安定であるかぎり、酵素

量に実質的上限は存在しない。

本発明の製法で使用するGCHは、大腸菌由来であり、大腸菌例えばB株(野性株)の溶菌、硫酸分画、AcA34ゲル濾過、GTP-セファロース分画により得ることができる。B株は、例えば、JB6034(国立遺伝研究所)として入手可能な大腸菌またはATCC 23848として入手可能な大腸菌である。

PTPSは、哺乳類、例えばラットの肝より得られた粗抽出物を硫酸分画、熱処理、ヒドロキシアバタイトクロマトグラフィー、ブチルトヨバルクロマトグラフィー、セファデックスG100ゲル濾過、Mono Qイオン交換クロマトグラフィーにより精製することにより得ることができる。

また、SPRは、哺乳類例えばラットの赤血球の溶血、硫酸分画、ブチルトヨバルクロマトグラフィー、ヒドロキシアバタイトクロマトグラフィー、レッドセファロースCL-6Bにより得ることができる。

- 15 -

本発明の製法においては、GCHがKClで活性化され、PTPSは $Mg^{2+}$ が活性発現に必須であり、またSPRの活性発現にはNADPHを要することを考慮して、これら活性化因子および補酵素は互いに他の酵素反応を阻害しない濃度範囲で設定されればよい。KClの濃度は、好ましくは0.05~0.50M、特に好ましくは0.10Mであり、 $Mg^{2+}$ の供給源としての $MgCl_2$ の濃度は、好ましくは5~50mM、特に好ましくは5~20mM、およびNADPHの濃度は、好ましくは4mM以上、特に好ましくは4mMがよい。基質GTPの濃度は、特に限定されないが0.2mM以下が好ましく、特に0.1~0.2mMが好ましい。GTPの濃度が0.2mMを大幅に越えると、GTPのジヒドロネオプテリントリホスフェートへの変換効率が低下するという不都合が生じる。

各種反応条件は、本反応が阻害されない範囲で設定すればよいが、溶媒としては、適宜ジチオエリトリール、ジチオスレイトールなどの還元剤やエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などの重

このようにして得られた酵素標品は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、その精製程度あるいは十分に精製単離されているかどうか知ることができ、また、必要であればこれにより分子量を知ることができる。さらに、得られた酵素標品はアミノ酸配列自動分析機によってアミノ末端のアミノ酸配列が分析される。あるいは、蛋白質分解酵素を用いて得られた酵素標品を分解し、高速液体クロマトグラフィーを用いて、ペプチドを分離し、同様にアミノ酸配列を決定することができる。

本発明においては前記のとおり本発明の製法に使用するために特に適する酵素も提供されたが、これらの各酵素は、アミノ末端のアミノ酸配列および部分アミノ酸配列により、新しい構造をもつ酵素であることがわかった。本発明は、新しいアミノ酸配列を見出したことにより、これらをコードする本酵素の遺伝子の単離、さらには組換えDNA技術による本発明の酵素の大量生産の材料を提供する。

- 16 -

金属キレート剤を加えて、リン酸緩衝液等の適当なpH調節剤を用いればよく、反応pHおよび温度は本酵素の特性により決定され、pHは概ね6~8、特に7付近が好ましく、温度は概ね25~42℃、特に37℃付近が好ましい。反応時間は概ね5分~1時間である。こうして反応混合物中に生成したBH4の回収は、HPLC等のクロマトグラフィーによる分離法その他により行うことができる。本発明の製法によるBH4の原料(GTP)に対する収率は、約80%もしくはそれ以上であり、従来の方法に比べて極めて収率が高い。

また、前記したごとく、ラット由来のGTPシクロヒドロラーゼIは、BH4合成の律速酵素であり、また種々の活性調節を受けることが知られている。そこで本発明者らは、ラット肝よりGTPシクロヒドロラーゼIを精製してその性質を明らかにした。本酵素のcDNAクローニングを行い、全一次構造を決定した。ラット肝ポリ(A)<sup>+</sup>RNAからλZAP II cDNAライブラリーを作成し、リジルエンドペプチダーゼ分解によって得

たペプチドの部分アミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、それをプローブに用いてスクリーニングを行い、1.0 kbの挿入断片を持つクローンを得た。このクローンは241アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしており、上記リジルエンドペプチダーゼ分解で分離した8個のペプチドのアミノ酸配列と完全に一致する8領域を含んでいた。塩基配列から予想されるアミノ酸配列とNBRF蛋白質データベースを比較したところ、GTPシクロヒドラーゼIのアミノ酸配列の一部が、ジヒドロ葉酸還元酵素のジヒドロ葉酸結合部位と同定されているアミノ酸配列とホモロジーを示すことが明らかになった。ジヒドロ葉酸の構造と類似しているBH4により、本酵素が活性阻害を受けることから、この部分はプテン結合部位ではないかと考えられる。

以下本発明を実施例を用いてさらに詳しく説明するが、もとより本発明は実施例のみに限定されるものではない。

#### 実施例1 GCHの抽出・精製

を含むpH8.0の50 mMトリス塩酸緩衝液(緩衝液B)に溶かし、5 Lの緩衝液Bに対して2回交換して透析した。

AcA34ゲル濾過: 透析した酵素液を12000×gで20分間遠心分離後、上清を得た。この上清57 mLを限外濾過膜(アミコン社製、PM-10)を用いて24 mLまで濃縮した。この濃縮した酵素液を緩衝液Bで平衡化した5×83 cmのAcA34ゲルカラムを用いて流速60 mL/時間でゲル濾過を行い、活性分画を得た。

GTP-セファロース分画: ゲル濾過の活性分画を、2.5 mM EDTAを含むpH7.0の10 mMカリウムリン酸緩衝液(緩衝液C)で平衡化したGTP-セファロースカラムへ流速60 mL/時間で吸着させ、0.3 M KClを含む緩衝液C 40 mLと緩衝液C 90 mLで連続して洗浄した。次にこのカラムに0.25 mg/mLのGTPを含む緩衝液Cを流速10 mL/時間で流し、GCHの活性分画を得た。

大腸菌としてはB株(野性株、国立遺伝研究所、JB6034)を用いた。大腸菌B株を、以下のようにして溶菌、硫酸分画、AcA34ゲル濾過、GTP-セファロース分画して、約1400倍に精製した。各工程の蛋白質量、活性収率および比活性は後記第1表に示す。

溶菌操作: -70℃で保存しておいた大腸菌245 gを、pH8.0の0.3 Mトリス塩酸緩衝液(緩衝液A)420 mLとブレンダー中で混和し、各回5分間の音波処理を5回を行い、菌を破壊した。この溶菌液を12000×g、20分間遠心分離し、上清を得た。沈渣は緩衝液A 91 mLに懸濁し、音波処理を5分間行い同様に遠心分離後、上清を得、先の上清と混和した。

硫酸分画: 溶菌液535 mLに100%飽和硫酸229 mLを加え、20分間攪拌後、12000×gで20分間遠心分離し、上清を得た。この上清722 mLに100%飽和硫酸149 mLを加え、20分間攪拌後、12000×gで20分間遠心分離し、沈渣を得た。この沈渣を0.3 M KCl

- 20 -

第1表

工程	蛋白質 含量 (mg)	活性 収率 (%)	比活性 (nmol/h /mg 蛋白質)
溶菌	33,000	100	0.25
硫酸分画	5,000	67	1.1
AcA34	2,500	55	1.9
GTP-セファロース	4.6	20	360

なお、酵素活性の測定は下記のごとく行った。反応液である0.1 mM GTPと2.5 mM EDTAを含むpH8.5の0.1 Mトリス塩酸緩衝液495 μlに5 μlの酵素液を加え、37℃で30分間保温し、50 μlの0.9% I<sub>2</sub>と1.8% KIを含む1 N塩酸を加え、遮光して室温で1時間放置した。この液に2%アスコルビン酸50 μl、1 N水酸化ナトリウム50 μlと3ユニットのアルカリフォスファターゼ液100 μlを加

- 19 -

え、37℃で1時間保温した。この液に1Nの酢酸100μlを加え、遠心分離後上清を得た。この上清を1mM EDTAを含むpH7.0の10mMナトリウムリン酸緩衝液で平衡化した4.6×250mmの5μm C18逆相カラムに流速0.8ml/分でインジェクトし、350nm動起、440nm蛍光検出器を用いてGCH反応産生物であるジヒドロネオブテリントリフォスフェート由来のネオブテリンを分離定量する。

また、下記のようにして比活性を測定し、Km 0.05/μMを決定した。即ち、GTPを0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8および1.0μM含む上記反応液を用いてGCHの初速度を決定し、Lineweaver-Burkのプロットを作成し、Kmを決定した。

分子量の測定は下記のようにして行った。最終クロマトグラフィー分画のSDSポリアクリルアミド電気泳動分析により、分子量は約26,000と推定され、またAcA34ゲル通過によれば

約200,000であり、本酵素はオリゴマー酵素と考えられる。

SDSポリアクリルアミド電気泳動: Laemmliの方法に従い、12.5%アクリルアミドゲルを用いて行った。標準蛋白質として、フォスホリラーゼb(94,000)、ウシ血清アルブミン(66,000)、オブアルブミン(43,000)、カーボニックアンヒドラーゼ(30,000)およびソイビントリプシンインヒビター(20,000)を電気泳動し、その泳動位置との比較によりGCHの分子量を決定した。

AcA34ゲル通過: 精製過程に用いたゲルを用いて同じ条件下で標準蛋白質として、サイログロブリン(669,000)、フェリチン(440,000)、B-アミラーゼ(200,000)、アルコール脱水酵素(150,000)、ウシ血清アルブミン(66,000)、カーボニックアンヒドラーゼ(29,000)およびチトクロームc(12,400)をゲル通過し、その溶出位置との比較よりGCHの分子量を決定した。

- 24 -

最終クロマトグラフィー分画のGCHを下記の方法によって、アミノ末端25個のアミノ酸配列および内部の部分アミノ酸配列を決定した。

アミノ酸配列の決定: 精製したGCH 540 pmoleを10%トリクロロ酢酸で沈澱させて、6M Guanidiniumに溶解し、pH9.0のトリス塩酸緩衝液にて最終濃度2M Guanidiniumを含む50mMトリス塩酸緩衝液溶液なるように希釈した。これに、GCHの1/400モル即ち、1.35 pmoleのリジルエンドペプチダーゼを加え、30℃で5時間保温しGCHを分解した。この液を5%アセトニトリルを含む0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化した4.6×250mmの5μm C18逆相カラムにインジェクトし、つづいて5%から60%までのアセトニトリルグラジエント溶出を、流速1.0ml/分、勾配1%/2ml平衡化緩衝液にて30℃にて行った。検出は220nmのUVで行い、吸収ピーク画分をエッペンドルフチューブに回収した。溶出の結果を第1図に示す。得られたペプチドと分解していない蛋白質のアミノ酸配列

をモデル120A高速液体クロマトグラフィー装置に接続したアプライドバイオシステムズ社の470A型自動ガス相蛋白質配列決定装置を用いて決定した。

蛋白質のN末端

Pro-Ser-Leu-Ser-Lys-Glu-Ala-Ala-Leu-Val-  
His-Glu-Ala-Leu-Val-Ala-Arg-Gly-Leu-Glu-  
Thr-Pro-Leu-Arg-Pro

5μm C18逆相カラムから溶出したペプチド断片のアミノ酸配列決定の結果は次のとおりである。

ピーク I

Ile-Thr-Leu-Ile-Glu-Asn-Lys

ピーク II

Ser-Ser-Gln-Asn-Thr-Arg-His-Gln-Phe-Leu-  
Arg-Ala-Val-Arg-His-His-Asn

ピーク III

Ala-( )-Gly-Ile-( )-Asp-Ala-Thr-Ser-Ala-

Thr

ピーク IV



Glu-Ala-Ala-Leu-Val-His-Glu-Ala-Leu-Val-  
Ala-Arg-Gly-Leu-Glu-

## ピーク V

Met-Lys-Val-Asp-Glu-Met-Val-Thr-Val-Arg-  
Arg-Ile-( )-Leu

## ピーク VI

Met-Tyr-Val-Asp-Glu-Ile-Phe-Ser-Gly-Leu-  
Asp-Tyr-Ala-Asn-Phe-Pro

## ピーク VII

Ser-Leu-Ile-Ala-Gly-His-Met-Thr-Glu-Ile-  
Met-Gln-Leu-Leu-Asn-( )-Asp

## ピーク VIII

Ile-Asn-Arg-Ile-Val-Gln-Phe-Phe-Ala-Gln-  
Arg-Pro

## 実施例 2 PTPS の抽出・精製

ラット肝 650 g を雄の KBL: Wistar  
系ラット 60 匹より得た。この肝を、硫酸分画、  
熱処理、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、  
ブチルトヨバルクロマトグラフィー、セフ  
ァデックス G100 ゲル濾過、Mono Q イオ

- 27 -

た。

熱処理: 透析した酵素液を 15000×g で  
20 分間遠心し、上清を得た。沈渣は pH 6.0 の  
10 mM カリウムリン酸緩衝液に溶かし、再び同条  
件にて遠心後、上清を得、先の上清と混和した。  
この酵素液を 60 ml ずつ 80℃ の温浴中で攪拌し  
ながら熱処理して、12000×g で 20 分間遠  
心して、上清を得た。この上清 347 ml を限外濾  
過膜 PM-10 を用いて 79 ml になるまで濃縮後、  
pH 6.0 の 1 mM カリウムリン酸緩衝液 (緩衝液 B)  
5 l に対して透析した。

ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー:

透析した酵素液を緩衝液 B で平衡化した 2.8×  
43 cm のヒドロキシアパタイトのカラムに流速 6  
0 ml/時間 で吸着させた。このカラムを 260 ml  
の緩衝液 B にて洗浄後、700 ml の pH 6.0 のリ  
ン酸 1 mM から 200 mM のカリウムリン酸緩衝液の  
グラジエント溶出を行うと、約 50 mM のリン酸濃  
度で PTPS 活性が溶出された。

ブチルトヨバルクロマトグラフィー: ヒド

ン交換クロマトグラフィーで以下のようにして、  
約 32,000 倍に精製した。各工程の蛋白質量、  
活性収率および比活性を後記第 2 表に示す。

硫酸分画: -70℃ に保存しておいた肝 65  
0 g を、5 mM 2-メルカプトエタノールと 0.  
2 mM フェニルメチルサルフォニルフルオラドを含  
む pH 7.0 の 50 mM カリウムリン酸緩衝液 (緩衝  
液 A) 1300 ml 中でブレンダーを用いて破壊し  
て、ホモジェネートを得た。このホモジェネート  
を 1300 ml の緩衝液 A と混和した後、ウルトラ  
トラック社製のブレンダーを用いて更に組織を  
破壊した。このホモジェネートを 12000×g  
で 20 分遠心した後、上清を得た。この上清 (2  
560 ml) に 100% 飽和の硫酸液 1100 ml を  
加え、20 分攪拌後、12000×g、20 分間  
遠心して上清を得た。この上清に 100% 飽和の  
硫酸液 1130 ml を加え、20 分攪拌後、120  
00×g、20 分間遠心し、沈渣を pH 6.0 の 1  
0 mM カリウムリン酸緩衝液に溶かした。この酵素  
液を 5 l の同緩衝液に対して 4 回交換して透析し

- 28 -

ロキシアパタイトクロマトグラフィーで得られた  
活性画分に、その容量の半分量の 90% 飽和硫酸  
を含む pH 6.0 の 50 mM カリウムリン酸緩衝液を  
加えた。この酵素液を 30% 飽和硫酸を含む pH 6.  
0 の 50 mM カリウムリン酸緩衝液 (緩衝液 C) で  
平衡化した 1×5 cm のブチルトヨバルカラムに  
流速 40 ml/時間 で吸着させた。このカラムを 4  
0 ml の緩衝液 C で洗浄した後、40 ml の緩衝液 C  
から硫酸を含まない緩衝液 C までのグラジエント  
溶出を行うと、約 20% 飽和硫酸にて PTPS 活  
性が溶出された。

セファデックス G100 ゲル濾過: ブチルト  
ヨバルカラムクロマトグラフィーで得られた活  
性画分を限外濾過膜 アミコン社製 セントリフロー  
CF25 を用いて 1.1 ml まで濃縮した。この酵  
素液を 30 mM の KCl を含む pH 7.0 の 20 mM カ  
リウムリン酸緩衝液 (緩衝液 D) で平衡化した 1.  
5×89 cm のセファデックス G100 カラムを用  
いて流速 5 ml/時間でゲル濾過を行い、活性画分  
を得た。

- 30 -

Mono Q イオン交換クロマトグラフィー：  
ゲル濾過で得られた活性画分を緩衝液 D で平衡化  
した 0.5 × 5 cm の Mono Q イオン交換カラム  
に流速 0.5 ml/分 で吸着させた。このカラム  
を 3 ml の緩衝液 D にて洗浄後、10 ml の緩衝液 D  
から 400 mM の KCl を含む緩衝液 D までのグラ  
ジエント溶出を行うと、KCl 180 mM を含む  
溶出液の付近に PTPS 活性が単一ピークで溶出  
された。

第 2 表

工程	蛋白質量 (mg)	活性収率 (%)	比活性 (nmol/h /mg 蛋白質)
粗抽出	112,000	100	0.68
硫酸分画	41,400	95	1.8
熱処理	609	33	41
ヒドロキシアパタイト	47.6	19	300
デキストラン	4.77	18	2,900
ヒドロキクス G100	0.60	17	22,000
Mono Q	0.57	16	22,000

- 31 -

た。

また、下記のようにして比活性を測定し、Km  
9.1 μM を決定した。即ち、ジヒドロネオプテ  
リントリフォスフェートを、1, 2, 5, 10, 20 お  
よび 50 μM を含む上記反応液を用いて PTPS の初  
速度を決定し、Lineweaver-Burk のプロットを作  
成し、Km を決定した。

分子量の測定は実施例 1 と同様に、SDS ポリ  
アクリルアミド電気泳動分析および HPLC ゲル  
濾過で行った。ただし、ゲル濾過は平衡化緩衝液  
として 0.1 M EDTA を含む pH 7.5 の 50  
mM カリウムリン酸緩衝液を用い、カラムは 1.5  
× 47 cm のものを用い、流速は 5 ml/時間にて行  
った。最終クロマトグラフィー分画の SDS ポリ  
アクリルアミド電気泳動分析により、分子量は約  
17000 と推定され、また HPLC ゲル濾過に  
よれば、約 93,000 であった。この結果から  
本酵素はオリゴマー酵素と考えられる。

最終クロマトグラフィー分画の PTPS を下記  
の方法によって、アミノ末端 2 個のアミノ酸配

なお、酵素活性の測定は、生成物である 6-ビ  
ルボイルテトラヒドロプテリンがアルカリ中でヨ  
ード酸化され、プテリンとなることを利用して、  
反応生成物をプテリンとして定量した。

酵素活性の測定： 反応液である 50 μM ジヒ  
ドロネオプテリントリフォスフェート、8 mM M  
gCl<sub>2</sub> および 10 mM ジチオスレイトールを含む  
pH 7.4 の 100 mM トリス塩酸緩衝液 18 μl に、  
2 μl の酵素液を加え、37℃ で 30 分間保温後、  
0.9% I<sub>2</sub> と 1.8% KI を含む 1 N 水酸化ナ  
トリウム液 200 μl を加え、遮光し、室温にて  
1 時間放置した。この液に 1 N 塩酸 200 μl と  
5% アスコルビン酸 50 μl を加え、遠心後上清  
を得た。この上清を 0.1 M EDTA と 5% メ  
タノールを含む pH 5.0 の 50 mM ナトリウム酢酸  
緩衝液で平衡化した 4.6 × 250 mm の 5 μm C  
18 逆相カラムに流速 0.8 ml/分 でインジェク  
トし、350 nm 励起、440 nm 蛍光検出器を用い  
て、PTPS 反応生成物である 6-ビルボイルテ  
トラヒドロプテリン由来のプテリンを分離定量し

- 32 -

列および内部の部分アミノ酸配列を決定した。

アミノ酸配列の決定： 精製 PTPS 1 nmol  
を用いて、実施例 1 のアミノ酸配列決定と同様の  
方法で N 末端のアミノ酸配列を決定した。精製 P  
TPS (1 nmol) の分解、ペプチド分離およびア  
ミノ酸配列決定も実施例 1 と同様の方法で行った。  
ただし、酵素による分解はリジルエンドペプチダ  
ーゼの他 V8 蛋白質分解酵素によっても行い、後  
者による分解反応は、PTPS 1 nmol をトリク  
ロロ酢酸沈殿後、6 μl の 6 M グアニジンに溶解  
し、つづいて pH 7.7 の 0.5 M アンモニウム酢  
酸緩衝液 10 μl と H<sub>2</sub>O 8.2 μl を加え、  
V8 蛋白質分解酵素を 5 pmol 加え、37℃ で 12  
時間反応させた。この分解物を実施例 1 と同様に  
してペプチド分解してアミノ酸配列の決定を行っ  
た。それぞれ、リジルエンドペプチダーゼおよび  
V8 蛋白質分解酵素で分解したペプチドを、C1  
8 逆相カラムで実施例 1 と同様に溶出した結果を  
第 2 図および第 3 図に示す。

- 33 -

蛋白質のN末端

NH<sub>2</sub>-Val-Gly-Leu-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Leu-Ser-  
Arg-Leu-Val-Ser-Phe-( )-Ala-( )-His-Arg-  
Leu-His-( )-Pro

C18逆相カラムから溶出したペプチド断片の  
アミノ酸配列決定の結果は次のとおりである。

Lys I Pro-Leu-Asn-His-( )-Lys

Lys II ( )-Asn-Asn-Pro-Asn-Gly-His-Gly-( )-Asn-  
Asp

Lys III Val-Phe-Gly-Lys

Lys IV Val-Tyr-Glu-Thr-Asp-Asn-Asn-Ile-Val-Val-  
Tyr-Lys-Gly-Glu

Lys V Glu-Tyr-Met-Glu-Glu-Ala-Ile-Met-Lys-Pro-  
Leu-Asp

Lys VI Val-Val-Val-Thr-Ile-His-Gly-Glu-Ile-Asp-  
Pro-Val-Thr-Gly-Met-Val-( )-Asn-Leu

V8 I Thr-Asp-Asn-Asn-Ile-Val-Val-Tyr-Lys-Gly-  
Glu

V8 II Asn-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Pro-Val-Gly-Ala-  
Leu-Tyr

V8 III Ala-Ile-Met-Lys-Pro-Leu-Asp-His-Lys-Asn-  
Leu-Asp-( )-( )-Val

V8 IV Ile-Asp-Pro-Val-Thr-Gly

なお、上記各配列中、カッコは未同定のアミノ  
酸である。

### 実施例3 SPRの抽出・精製

ラット赤血球を雄のKBL:Wistar系の  
ラット30匹より得た。得られた赤血球を、溶血、

- 35 -

硫酸分画、ブチルトヨバールクロマトグラフィー、  
ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、レッ  
ドセファロースCL-6Bゲル濾過で、以下のよ  
うに約1100倍に精製した。各工程の蛋白質量、  
活性収率および比活性を後記第3表に示す。

溶血: -70℃に保存しておいたラット赤血  
球約116gを、466mlの0.2Mフェニルメ  
チルサルフォニルフルオリドを含むpH7.0の5  
mMカリウムリン酸緩衝液(緩衝液A)とブレンダ  
ー中で混和し、氷上で1時間攪拌後、9.500  
×gで30分間遠心を行い、抽出液①を得た。沈  
渣は再び291mlの緩衝液A中で1時間攪拌後、  
同様に遠心し、抽出液②を得た。抽出液①および  
②を混和した。

硫酸分画: 溶血により得た抽出液710mlに  
163gの硫酸を加え、20分攪拌した後、13.  
000×gで30分間遠心を行い、その上清78  
0mlに硫酸69.5gを加え、20分攪拌後、1  
3.000×gで30分遠心を行い沈渣を得た。  
この沈渣を53mlのpH6.0の10mMカリウムリ

ン酸緩衝液に溶解した。

ブチルトヨバールクロマトグラフィー: 硫酸  
分画53mlと53mlの60%飽和硫酸を含むpH6.  
0の50mMカリウムリン酸緩衝液を混和した。こ  
の酵素液を30%飽和硫酸を含むpH6.0の50  
mMカリウムリン酸緩衝液で平衡化した10mlのブ  
チルトヨバールカラムへ流速40ml/hで吸着さ  
せた。このカラムに10mlの30%飽和硫酸を含  
む同緩衝液および10mlの15%飽和硫酸を含む  
同緩衝液を順に流した後、酵素を15%飽和硫酸  
から0%硫酸までの100mlの同緩衝液のグラジ  
エントにて溶出すると、約8%飽和硫酸の位置に  
セピアブテリン還元酵素活性が溶出された。

ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー:

ブチルトヨバール溶出の活性画分12mlを、セフ  
ァデックスC-25 200mlを用いて、pH6.  
0の10mMカリウムリン酸緩衝液に脱塩後、同緩  
衝液にて平衡化した1.0mlのヒドロキシアパタ  
イトカラムに吸着させた。このカラムを10mlの  
同緩衝液で未吸着画分を洗浄後、10mMから20

- 36 -

第3表

工程	蛋白質量 (mg)	活性収率 (%)	比活性 (nmol/h /mg 蛋白質)
溶血	2500	100	460
硫酸分画	160	94	6,600
ブチルセファロース	8.8	48	66,000
ヒドロキシアパタイト	0.53	13	270,000
レッドセファロース			
CL-6B	0.29	13	520,000

0 mMまでのカリウムリン酸緩衝液 50 ml のグラジエント溶出を行うと、リン酸濃度約 80 mM の位置に、セビアブテリン還元酵素活性が溶出された。

レッドセファロース CL-6B ゲル濾過: ヒドロキシアパタイト溶出の活性画分 2.8 ml に 2.8 ml H<sub>2</sub>O を加え、pH 6.8 の 20 mM カリウムリン酸緩衝液で平衡化した 1 ml のレッドセファロースカラムに吸着させた。このカラムを同緩衝液 2 ml で未吸着分を洗浄後、更に 0.1 M KCl を含む pH 6.8 の 50 mM カリウムリン酸緩衝液 10 ml を流し、つづいて 50 mM NADPH を含む同緩衝液にてセビアブテリン還元酵素活性を溶出した。

なお、酵素活性の測定は下記のごとく行った。

反応液である 50  $\mu$ M セビアブテリン、100  $\mu$ M NADPH および 0.1 mg/ml のウシ血清アルブミンを含む pH 6.4 の 100 mM カリウムリン酸緩衝液 47.5  $\mu$ l に 2.5  $\mu$ l の酵素液を加え、25℃で10分間保温後、200  $\mu$ l の酸性ヨウ素液を加え、室温にて1時間遮光して放置した。

- 38 -

つづいて、250  $\mu$ l の 1% アスコルビン酸を加えた後、5  $\mu$ m C18 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（平衡化緩衝液は 5% メタノールを含む pH 5.0 の 50 mM ナトリウム酢酸緩衝液を用い、流速 0.8 ml/分、25℃で分析した）にて酵素反応生成物ジヒドロバイオブテリンの酸化物であるバイオブテリンを分離定量した。

また、下記のようにして、セビアブテリンに対する  $K_m$  9.4  $\mu$ M を決定した。即ち、セビアブテリン 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75 および 100  $\mu$ M を含む上記反応液を用いてセビアブテリン還元酵素の初速度を決定し、Lineweaver-Burk のプロットを作成し、 $K_m$  を決定した。

分子量の測定は実施例 1 と同様の SDS ポリアクリルアミド電気泳動で行った。最終ゲル濾過で得られた SPR の SDS ポリアクリルアミド電気泳動分析により、分子量は約 28,800 と推定された。また HPLC ゲル濾過によれば、分子量は約 56,000 であった。これらの結果から本

- 40 -

酵素はダイマー酵素と考えられる。

最終クロマトグラフィー分画の SPR の部分アミノ酸配列を、2 nmole の SPR 精製標品を用いて実施例 1 と同様の方法によって決定した。リジルエンドペプチダーゼで分解した SPR を C18 逆相カラムで実施例 1 と同様に溶出した結果を第 4 図に示す。カラムから分離溶出されたペプチドのアミノ酸配列決定の結果は次の通りであった。

#### ピーク I

Leu-Leu-Ser-Leu-Leu-Gln-Arg-Asp-Thr-Phe-Gln-Ser-Gly-Ala-His-Val-Asp-Phe-Tyr-Asp-Ile

#### 実施例 4 安定・至適 pH の測定

下記のようにして、pH と酵素活性の関係を調べた。

(1) GCH については実施例 1 に示した反応液組成を用いて緩衝剤のみを 50 mM ナトリウム酢酸、MES、カリウムリン酸、Hepes、Tris またはナトリウムグリシン緩衝液に代えて、かつ

KCl 0.1 M の存在もしくは非存在下で調べた。

(2) PTPS については(1)のごとく、緩衝液のみを代えて、実施例 2 に示した反応条件で行った。この酵素に対しては、0.1 M KCl の効果は認められなかった。

(3) SPR については、75 mM にて(1)のごとく緩衝液のみを代えて、実施例 3 に示した反応条件で 0.1 M KCl の存在もしくは非存在下で調べた。

結果を第 5 図に示す。この第 5 図より明らかのごとく、GCH、PTPS および SPR は、7 付近に至適 pH を有することが分かる。なお、第 5 図中のプロットの意味は次の表に示すとおりである。

KCl 0.1 M の有無

(-)	(+)	緩衝液
●	○	酢酸ナトリウム
■	□	MES (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)
▲	△	リン酸カリウム
▼	▽	HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-エタンスルホン酸)
◀	◁	Tris
◆	◇	グリシンナトリウム

緩衝液濃度は、GCH および PTPS については 50 mM、SPR については 75 mM で試験した。

実施例 5 ワンボット法による BH<sub>4</sub> の製造

下記組成により BH<sub>4</sub> の合成を行った。

50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)

0.2 mM GTP

0.1 M 塩化カリウム

- 44 -

10 mM ジチオエリトリール  
4 mM NADPH  
8 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM EDTA  
770 μg / ml\* 大腸菌由来 GCH シクロヒドロラーゼ I  
96 μg / ml\* ラット肝由来 6-ビルボイル  
テトラヒドロプロテリン合成酵素  
8 μg / ml\* ラット赤血球由来セピアブ  
リン還元酵素

(\* 反応液中での最終濃度)

上記組成の反応液を作成し、三酵素の混合液を最後に加え、37℃にて20分間反応を行い、5 mM ジチオスレイトール (DTT) を含む 0.2 N トリクロロ酢酸を加え遠心後上清を得た。反応生成物は強力カチオンイオン交換樹脂 (ワットマン SCX) 4.6 × 250 mm カラムを 5% メタノールを含む pH 3.8 の 0.1 M アンモニウム酢酸緩

衝液で平衡化し、流速 1 ml / 分で分析した。検出は電気化学検出器を用い 300 mV 電圧で測定した。その結果を第 6 図に示す。この分離系に、1 mM DTT を添加することにより、BH<sub>4</sub> を安定に分離回収した。

上記反応の経時的追跡結果を第 7 図に示す。出発 GTP からの BH<sub>4</sub> の収率は、約 75% であった。

実施例 6 ラット GTP シクロヒドロラーゼ I の部分配列の解析

ハタケヤマら (Hatakeyama, K., Harada, T., Suzuki, S., Watanabe, Y., および Kagamiyama, H. (1989) J. Biol. Chem. 264, 21660-21664) の方法で、ラット GTP シクロヒドロラーゼ I を精製し、リジルエンドペプチダーゼで分解した (GTP シクロヒドロラーゼ I / リジルエンドペプチダーゼ = 400 / 1 (モル比)、30℃、7 時間)。分解物は、0.1% トリフルオロ酢酸-5% アセトニ

リルで平衡化した5  $\mu$ m C18カラム(ナカライ  
テスク社製)を用いた5-40%アセトニトリル  
の直線濃度勾配(25℃、流速1.0 ml/分、6  
0分)の逆相クロマトグラフィーにより分画した  
(第8図)。分画されたペプチドの配列は、自動  
気相蛋白質配列分析機(アプライド・バイオシス  
テムズ社製、モデル470A)を用いて分析した。  
オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成

オリゴデオキシリボヌクレオチドをDNA合成  
機(アプライド・バイオシステムズ社製、モデル  
381A)を用い自動ホスホリアルミダイト法によ  
り製造した。これらオリゴヌクレオチドをT4ポ  
リヌクレオチドキナーゼおよび( $\gamma$ - $^{32}$ P)AT  
Pでラベルした。

#### cDNAの合成およびcDNAライブラリーのス クリーニング

全RNAをラット肝から抽出した(Chirg  
win, J. M., Przybyla, A. E.,  
MacDonald, R. J., および Rutter,  
W. J. (1979) Biochemis

try 18, 5294-5299)。ポリ(A)  
RNAは抽出した全RNAをオリゴ(dT)-セ  
ルロースクロマトグラフィーに供して単離した(  
Aviv, H., および Leder, P. (19  
72) Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA, 69, 1408-1412)。二本鎖c  
DNAは、cDNA合成キット(ファルマシア・  
エルケービー・バイオテクノロジー社製)を用いて  
グブラーおよびホフマンの方法に従って合成した  
(Gubler, V., および Hoffman,  
B. J. (1983) Gene (Amst.) 2  
5, 263-269)。平滑末端二本鎖cDNA  
をRNase T1 (0.1  $\mu$ g/ml)を追加して  
用いた他は、クリックシュタインらの方法に従っ  
て生成させた(Klickstein, L. B.  
および Neve, R. L. (1987) in Cu  
rrent Protocols in Mol  
ecular Biology (Ausubel,  
F. M., Brent, R., Kingston,  
R. E., Moore, D. D., Seidma

- 48 -

n, J. G., Smith, J. A., および S  
truhl, K., eds), pp 5.5, 1  
-5.5, 10. Greene Publish  
ing Associates and Wil  
ey-Interscience, New Yo  
rk)。cDNAの各平滑末端にEcoRI/N  
otIアダプター(cDNA合成キット:ファル  
マシア製)を連結したのち、該cDNAを $\lambda$ ZAP  
IIベクターDNA(ストラタジーン社製)のE  
coRI部位に挿入した。得られたライブラリー  
DNAをGigapack Gold(ストラ  
タジーン社製)を用いてin vitroでパッケ  
ージングし、大腸菌XL1-Blueに導入し  
た。

レプリカナイロンフィルター(デュボナーニュ  
ーイングランド ニュクレアー社製のGene S  
creen Plus)を用い、約3.0  $\times$  10<sup>5</sup>  
ブランクを、 $^{32}$ P-ラベル化合成オリゴヌクレオ  
チドプローブでスクリーニングした(Bent  
on, W. D., および Davis, R. W. (1

977) Science 196, 180-18  
2)。3つのプローブの塩基配列は、後に述べる  
ように、GTPシクロヒドロラーゼIのリジルエ  
ンドペプチダーゼ処理ペプチドのアミノ酸配列か  
ら推論される。1つのタイプのプローブとして、  
コドン利用分析(Lalthe, R. (1985)  
J. Mol. Biol. 183, 1-12)に基  
づき作成された単一の長鎖オリゴヌクレオチドと、  
他のタイプのプローブとして、全てのコドンコン  
ビネーションを有する短鎖オリゴヌクレオチドの  
混合物の2つのタイプのプローブを用いた。レプ  
リカナイロンフィルターは、5容量の0.1%ド  
デシル硫酸ナトリウム(SDS)を含むSSC(  
SSC溶液: 0.15M塩化ナトリウム、15mM  
クエン酸ナトリウムを含む)、10容量のDen  
hardt溶液(Denhardt溶液: 0.2  
%(W/V)のフィコール、ポリビニルピロリ  
ン、ウシ胎児血清アルブミンを含む)および0.  
1  $\mu$ g/mlの仔牛胸腺DNA(シグマ社製)の溶液  
で65℃で少なくとも3時間前処理をして用いた。

- 50 -

放射線ラベル化オリゴヌクレオチドプローブを前記溶液に加え、42℃で一晩フィルターをハイブリダイゼーションさせた (Maniatis, T., Fritsch, E. F., および Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。フィルターを長鎖オリゴヌクレオチドを除くために0.1% SDSを含む0.2容量のSSCで40℃で洗浄し、一方、短鎖オリゴヌクレオチドを除くために0.1% SDSを含む4容量のSSCで洗浄したのち、オートラジオグラフィーに供した。ハイブリダイゼーション-陽性クローンをブランク精製し、ファージをストラタジーン・オートマチック・エクシジョン・プロトコル (Stratagene automatic excision protocol) に従い、Bluescript plasmidに変換した。

- 51 -

ita, A., Shinohara, T., Takagi, T., および Sakaki, Y. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 89-99)、で、ウィルバーとリップマンのプログラム (Wilbur, W. J., および Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 726-730) によって修正した。

(結果)

ラットG.T.P.シクロヒドラーゼIの部分アミノ酸配列

8つのペプチドを単離し(第8図のI~VIII)、それらの完全なまたは部分的なアミノ酸配列を決定した(第10図に下線で示す)。精製酵素のN末端配列を30残基まで決定した:

Gly-Phe-Pro-Glu-Arg-Glu-Leu-Pro-Arg-Pro-  
Gly-Ala-Ser-Arg-Pro-Ala-Glu-Lys-Ser-( )-  
Pro-Pro-Gln-Ala-Lys-Gly-Ala-Gln-Pro-Ala.

なお、上記配列の第20番目のアミノ酸はcDNAからArgであることが決定された(第10

### ヌクレオチド配列の解析

cDNAインサートをM13ベクターのEcoRI部位にサブクローニングした (Vieira, J., および Messing, J. (1987) Meth. Enzymol. 153, 3-11)。インサートのヌクレオチド配列を Sequence kit Ver. 2.0 (7-denzed GTP-edition, United States Biochemical) と合成プライマーを用いて、ジデオキシセクエンターミネーション法によって決定した (Sanger, F., Nicklen, S., および Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467)。

### コンピューターによる配列解析

cDNA配列から推測されたアミノ酸配列は、クハラらによって開発されたデータベースシステム (GENAS) (Kuhara, S., Matsuo, F., Putamura, S., Fug

- 52 -

図参照)。

### cDNAクローンの単離

蛋白質性ペプチドのアミノ酸配列から、ユニークな配列を持つ3つの単一の長鎖オリゴヌクレオチド (5'-TTCCAGGCATCAGCAGGCTGGGCACCTTTGGCTTCAGG (第10図のペプチドIと蛋白質N末端配列の一部より: プローブ1); 5'-TTGGTGAAGAACTGCATGGCTGTGGCAGCTCTCCATGGGGT (ペプチドIV: プローブ2); 5'-ACGCCAGCAGGCTGCAGGGCTCTGTGATGGCCACAGCAATCTG (ペプチドVII: プローブ3)) および全てのあり得るコドンコンビネーションをカバーする2つの短鎖オリゴヌクレオチド混合物 (5'-TTCCA(G/A/T/C)GC(G/A)TC(G/A/T/C)GC (ペプチドI: プローブ4); 5'-GT(G/A)AA(G/A)AA(T/C)TGCA(T/G/A/T/C)GC (ペプチドIV: プローブ5)) を作成した。これらのクローンをラット肝ポリ(A)・RNA由来のλZAP II cDNAライブラリーの約3×10<sup>5</sup> クローンのスクリーニングのために用いた。4つのクローンがプローブ2、3および5でハイブリダイゼーション

された。短鎖ブローブの1つであるブローブ4は、 $\lambda$  ZAPブランクのシグナルが非常に弱いため検出されず、これらクローンとハイブリダイゼーションしなかったと考えられる。また、長鎖オリゴヌクレオチドブローブの1つであるブローブ1は、本ブローブの8塩基(21%)が誤って推定され、これらクローンとハイブリダイゼーションしなかったと考えられる。これらクローンを部分的に配列決定し、5'-および3'-非翻訳領域の長さの他は一致することを見出した。これらクローンのうち最も長鎖のものはポリ(dA)トラクトを含み、従って本クローンをさらに分析に供した。

完全なヌクレオチド配列

ラットGTPシクロヒドロラーゼ1のcDNAの一次配列を第9図に示すストラテジーに従って両鎖について決定した。その結果を第10図に示す。挿入断片はポリ(A)・テイルの8アデニン残基を含む、1024ヌクレオチドであった。オープンリーディングフレームは、723ヌクレオチドであり、それにつづく3'-非翻訳領域には

終止コドンTGAからポリ(A)テイルまで163ヌクレオチドであった。3'-非翻訳領域のポリ(A)テイルから13ヌクレオチド上流にポリアデニレーションシグナルAATAAAがあった。オープンリーディングフレームは、クローンの配列において最初のATGから開始し、241アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。開始コドン周辺の配列は、真核生物の開始部位として好ましいとされている配列(Kozak, M. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 857-872)と整合した。ヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列を第10図に示す。8つの蛋白質性ペプチドのアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から推定される配列と一致した。上に示した生成蛋白質のN末端は、推定されたアミノ酸配列の12~41番目の残基と完全に一致した。さらに、精製酵素のアミノ酸組成は、12~241番目の残基から推定される配列の組成とよく一致した(第4表)。

- 55 -

第4表

ラットGTPシクロヒドロラーゼ1の精製標品のアミノ酸組成とそのcDNAの一次配列から推定されるアミノ酸組成

アミノ酸	残基数	
	分析値 <sup>a)</sup>	推定値
アルギニン	18.21	18
リジン	11.85	12
ヒスチジン	5.25	5
アスパラギン酸	16.58	11
アスパラギン		6
トレオニン	11.74	12
セリン	17.00	13
グルタミン酸	29.82	19
グルタミン		11
プロリン	14.33	15
グリシン	18.02	14
アラニン	20.98	20

- 57 -

- 56 -

システイン	-	2
バリン	16.00	17
メチオニン	7.33	9
イソロイシン	11.12	12
ロイシン	19.62	20
チロシン	4.11	4
フェニルアラニン	7.96	8
トリプトファン	-	2

<sup>a)</sup> アミノ酸分析は蛋白質を110℃、24時間の酸加水分解後、日立L-8500型アミノ酸分析機を用いて、O-フタルアルデヒドのポストカラムラベル法により行った。

<sup>b)</sup> 測定せず。

したがって、ラットGTPシクロヒドロラーゼ1は、230のアミノ酸残基を有し、計算値として分子量25,815を有すべきものである；この値は、ハタケヤマら(前述)によって報告された精製蛋白質の分子量より14%小さい。これは、

- 58 -



Asn<sub>111</sub>-Gly<sub>112</sub>結合での後翻訳による切断が、推定された一次ポリペプチドを酵素の成熟体に変換するためであろう。この前配列は、3つの塩基性および1つの酸性残基を有し、ネットで正荷電しているが、分泌蛋白質のシグナルペプチドに共通してみられる長い疎水性領域を欠いている。よってこの前配列の機能は推定できない。他の3つのハイブリダイゼーション陽性クローンも同様の結果を与えた。

推定された蛋白質配列をナショナル バイオケミカル リサーチ ファウンデーション (National Biochemical Research Foundation) の蛋白質配列データベースと比較したところ、77~96のアミノ酸残基がジヒドロホレート還元酵素の高変換領域の残基 (Beverley, S. M., Ellenberger, T. E., および Cordingley, J. S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 2584-2588; Grumont, R., W

ashlien, W. L., Caput, D., および Santi, D. V. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5387-5391) と有意なホモロジーを有することを見出した (第11図)。これらの残基は、ジヒドロホレート還元酵素に対するメトトレキセートまたはジヒドロホレートの結合を引き起こすことがポリリンら及びマシュースらにより、結晶構造的に同定されている (Bolin, J. T., Filman, D. J., Matthews, D. A., Hamlin, R. C. および Kraut, J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13650-13662; Matthews, D. A., Bolin, J. T., Burridge, J. M., Filman, D. J., Volz, K. W., Kaufman, B. T., Bedell, C. R., Champness, J. N., Stammers, D. K., および Kraut, J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 381-391)。特に、

- 59 -

第11図に円で囲って示されるトリプトファンおよびフェニルアラニンは、これらの化合物のプテリン環と相互に作用する (上記ポリリンら及びマシュースらの文献参照)。対応トリプトファンおよびフェニルアラニン残基が、GTPシクロヒドロラーゼ1の配列に見出される。GTPシクロヒドロラーゼ1の活性は、ジヒドロホレート還元酵素のジヒドロホレートに対するKm値と比較して、それぞれ、12  $\mu$ M および 170  $\mu$ M のKi値を有するテトラヒドロピオプテリンおよびジヒドロホレートのようなプテリン類によって阻害され (Shen, R., Alam, A., および Zhang, Y. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 965, 9-15)、ジヒドロホレート還元酵素は、7, 8-ジヒドロピオプテリンをテトラヒドロピオプテリンに還元する (Kaufman, S. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3934-3943)。ピオプテリンと葉酸塩は、共通のプテリン部分を持つので、これらの結果は、GTPシクロヒドロラー

ゼ1がジヒドロホレート還元酵素のプテリン結合部位に類似したプテリン結合部位を有することおよび推定されたアミノ酸配列の77~96番の残基からなる領域がプテリンの結合に反応可能な部位であることを示唆する。

この結果より推定されたこのプテリン結合部位に部位特異的変異を行えば、BH4により阻害のかからないラットGTPシクロヒドロラーゼ1を遺伝子工学法により作成できる可能性がある。

#### (発明の効果)

本発明によれば、モノアミン神経伝達物質の欠乏障害による疾患の治療に有用な6-(R)-L-エリスロ-5, 6, 7, 8-テトラヒドロピオプテリン (BH4) を簡単な操作で効率よく製造できる。

また本発明はBH4の生理機能を理解するうえで有用なプローブとしての<sup>14</sup>Cラベル化BH4の製造にも有利に利用される。

さらに、本発明は、新しい構造 (アミノ酸配列) を持つ酵素を開示したことにより、これらをコー

ドするDNAをプローブとする本酵素の遺伝子の単離、さらには組換えDNA技術による本発明の酵素の大量生産の材料もしくは菌体内で本来菌が生産できないBH4を合成させるためのDNAを提供するものである。

#### 4. (図面の簡単な説明)

第1図は実施例1においてGCHをリジルエンドペプチダーゼで分解した後、C18逆相カラムクロマトグラフィーで、アセトニトリルにより溶出した様子を示す図である。

第2図は実施例2においてPTPSをリジルエンドペプチダーゼで分解した後、C18逆相カラムクロマトグラフィーで、アセトニトリルにより溶出した様子を示す図である。

第3図は実施例2においてPTPSをV8蛋白分解酵素で分解した後、C18逆相カラムクロマトグラフィーで、アセトニトリルにより溶出した様子を示す図である。

第4図は実施例3においてSPRをリジルエンドペプチダーゼで分解した後、C18逆相カラム

クロマトグラフィーで、アセトニトリルにより溶出した様子を示す図である。

第5図AはGCHの至適pHを示すグラフであり、第5図BはPTPSの至適pHを示すグラフであり、第5図CはSPRの至適pHを示すグラフである。

第6図は実施例5におけるワンボット法で合成したBH4をワットマンSCXカラムで単離した様子を示す図である。

第7図は実施例5におけるワンボット法でBH4を合成した際の、原料、中間生成物およびBH4の消長を示すグラフである。

第8図は実施例6で精製したラットGTPシクロヒドロラーゼIをリジルエンドペプチダーゼで分解した後、C18逆相カラムクロマトグラフィーで、アセトニトリルにより溶出した様子を示す図である。

第9図はラットGTPシクロヒドロラーゼIのcDNAの一次配列を決定するために用いたストラテジーを示す図である。

第10図はラットGTPシクロヒドロラーゼI

- 63 -

- 64 -

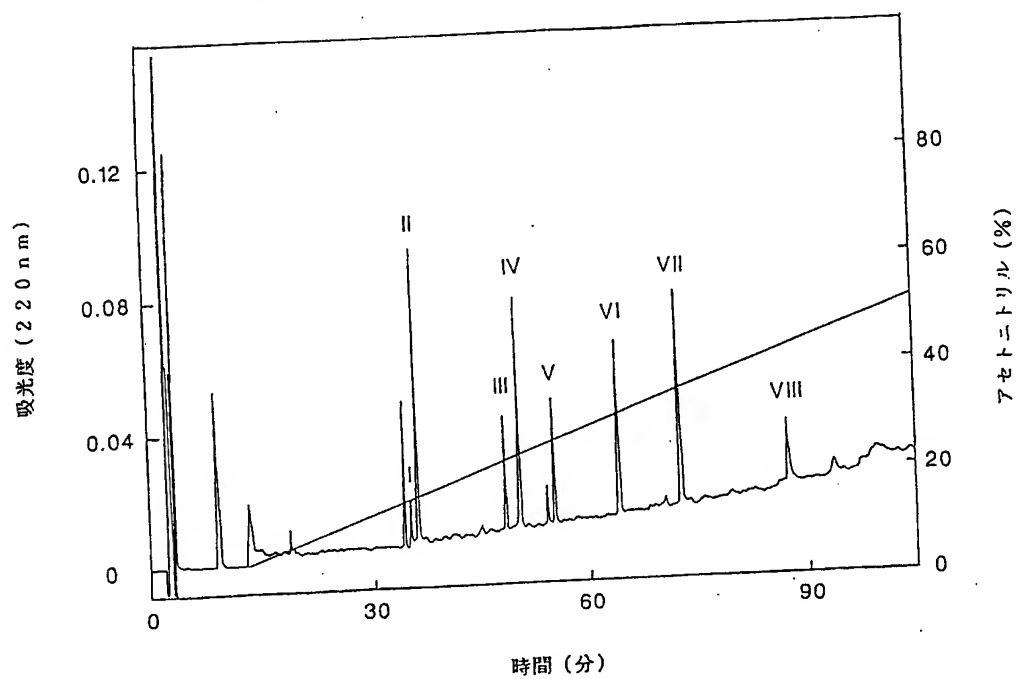
のcDNAの一次配列、および該配列から推定したアミノ酸配列を示す配列図である。

第11図はラットGTPシクロヒドロラーゼIが、ジヒドロホレート還元酵素のプテリン結合領域の残基と容易なホモロジーを有することを示す図である。

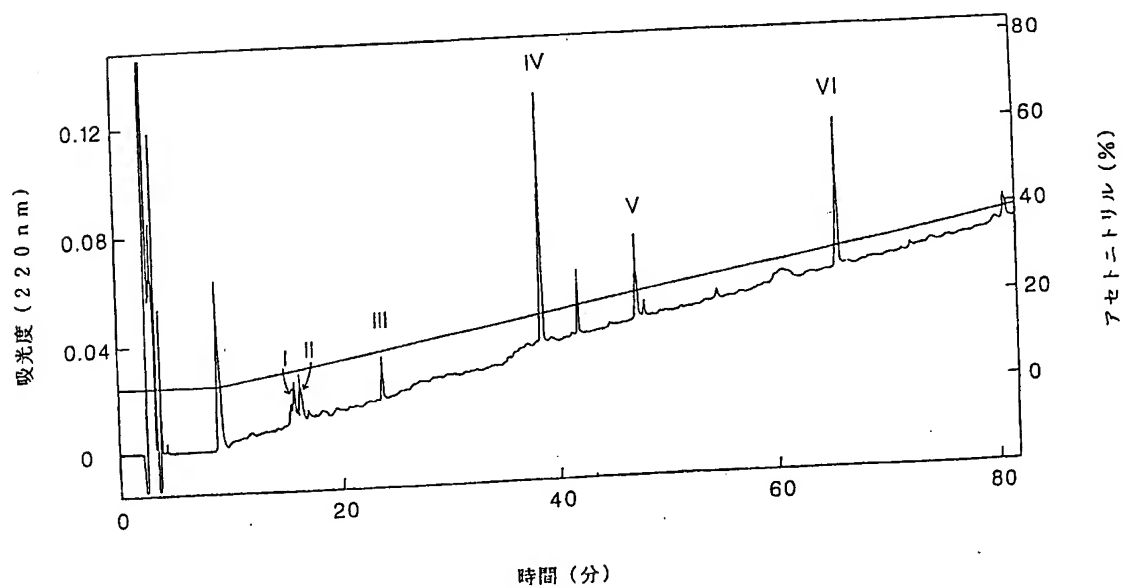
特許出願人 ザントリー株式会社  
代理人 弁理士 湯浅 恭 (4名)



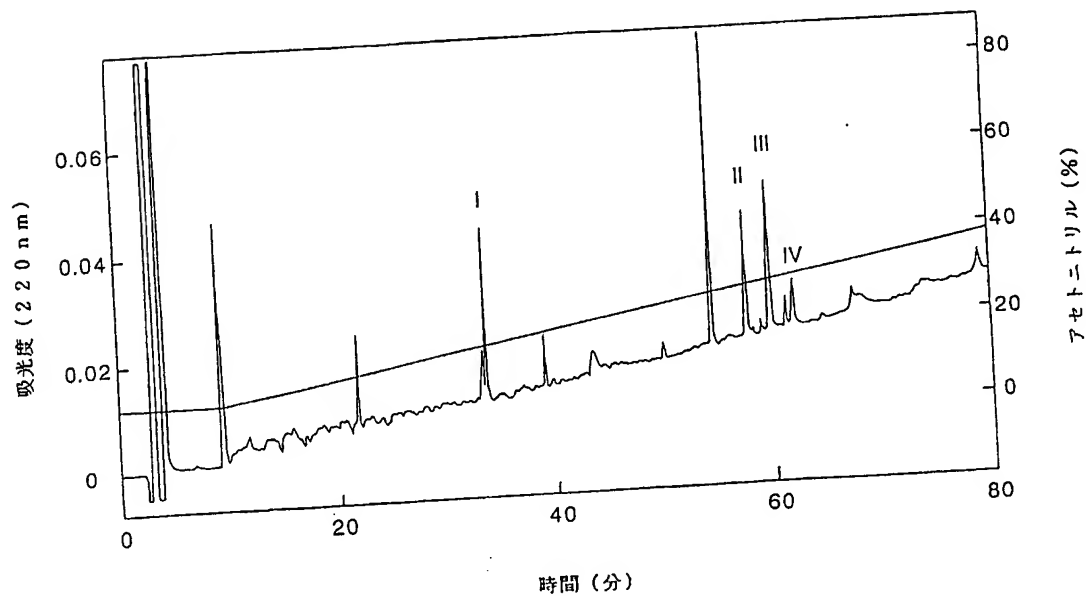
第 1 図 大腸菌GTPシクロヒドラーゼ I



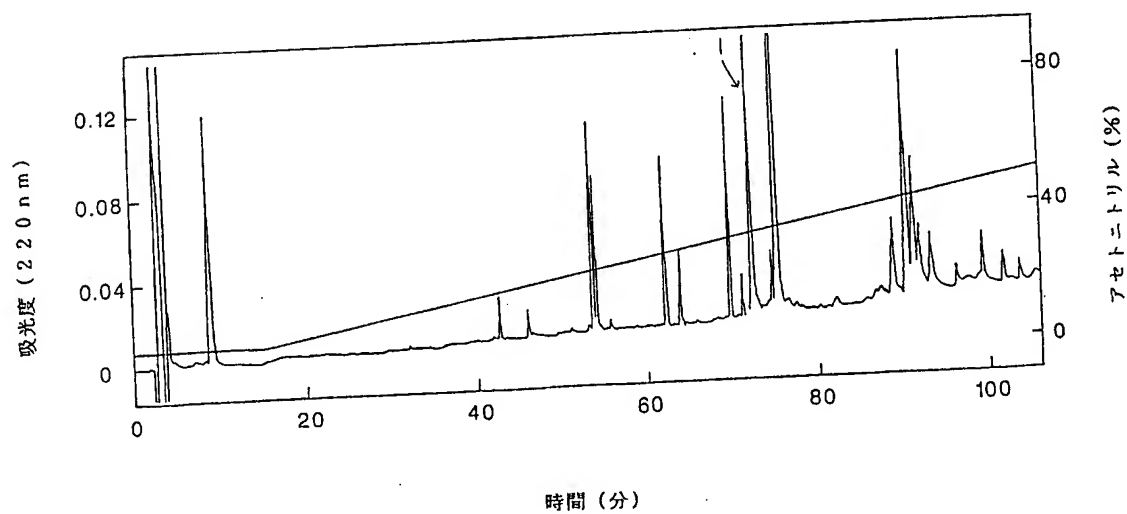
第 2 図 ラット6-ビルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素  
(リジルエンドペプチダーゼ分解物)



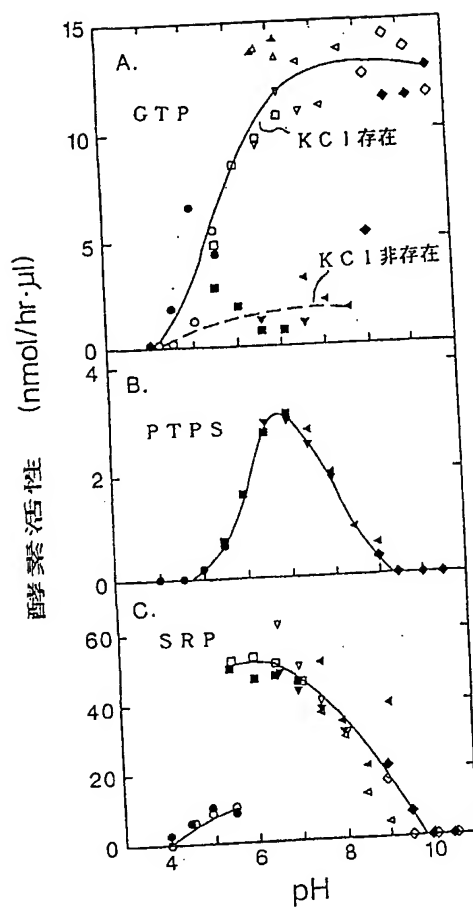
第3図 ラット6-ビルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素  
(V8プロテアーゼ分解物)



第4図 ラットセビアプテリン還元酵素



第 5 図

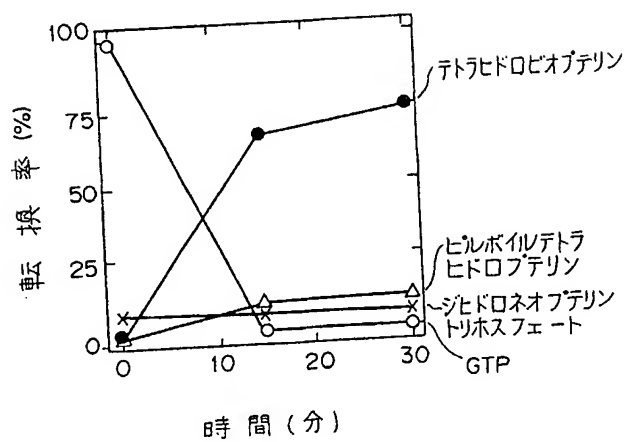


第 6 図

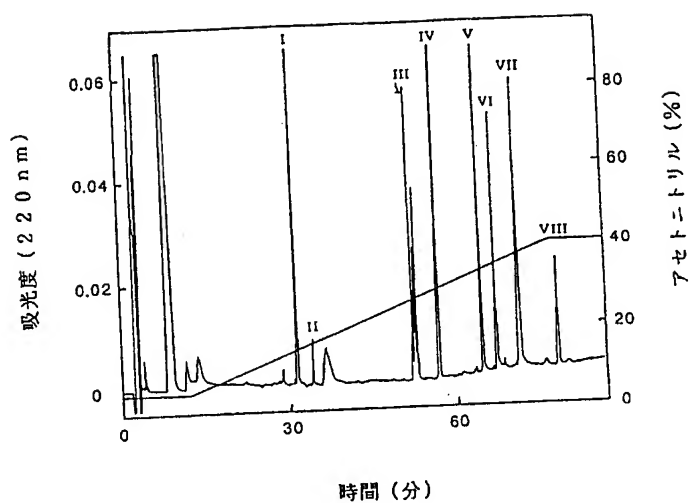


第 7 図

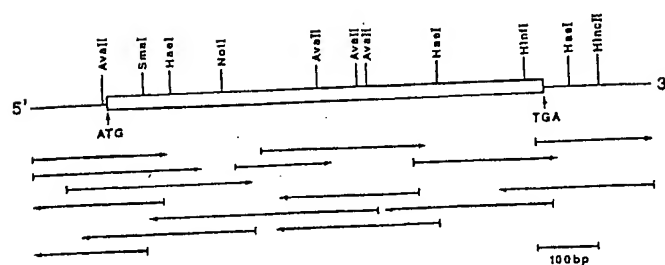
テトラヒドロビオプテリン合成の  
タイムコース



第 8 図



第 9 図



第 10 圖

6ACTTC6A -120

[illegible]

ATG GAG AAG CCG CGG GGT GTA AGG TGC ACC AAT GGG TTC CCC GAG CCG GAG CTG CCG CCG GGG GCC AGC CCA CCT GCC GAG AAG TCC  
1 Met Glu Lys Pro Arg Gly Val Arg Cys Thr Asn Gly Phe Pro Glu Arg Glu Leu Pro Arg Pro Gly Ala Ser Arg Pro Ala Glu Lys Ser →

31  
C66 CCG CCC GAG SCC AAG SGC GCA CAG CCA GCC GAC GCC TGG AAG GCA SGG C66 C66 CCC C6C AGC GAG GAT AAC GAG C6C AAC CTC CCC  
arg pro pro glu ala lys gly ala gln pro ala asp ala trp lys ala gly arg pro arg ser glu glu asp asn glu leu asn leu pro  
VII

ARC CTG GCG GCG GCT TAC TCG TCC ATC CTG CCG TCG CTG GCG GAG GAC CCC CAG CCG CTG GCG GCG CTC CTC AAG ACG CCC TGG AGG GCG GCC 270

ACC GCC ATG CAG TTC ACC AAG GGA TAC CAG GAG ACC ATC TCA GAT CTC CTG AAC GAT GCT ATA YII GAT GAG GAC CAT CAC GAG ATG 360

IV

GTG ATT GTG AAG GAC ATT GAC ATG TTT TCC ATG TGT GNG CAT CAC CTG GTC CCA YTT GTG SGA AGS GTC CAT ATT GGT TAT CTT CCT AAC

AAG CAA GTC CTT GGT CTC ACC AAA CTT GGC AGG ATT GTG GAA ATC TAC AGT AGA AGA CTA CAA GAT CAA GAA GGC CTT ACC AAA CAG ATT  
 Lys Gln Val Leu Gln Ser Lys Leu Ala Arg Ile Val Glu Ile Tyr Ser Arg Arg Leu Gln Val Gln Glu Arg Leu Thr Lys Gln Ile  
 151

181

Ala	Val	Ala	Ile	Thr	Glu	Gln	Pro	Ala	Gly	Val	Gly	Val	Ile	Glu	Ala	Thr	His	Met	Cys	Met	Val	Met	Arg	Gly	Val	Gln	
SCA	GTG	GCC	ATC	ACA	GAA	GCC	CTT	CAG	CTT	GCG	CTC	GCG	GTA	GTG	ATT	GAA	ACA	CAC	ATG	TGT	ATG	GTG	ATG	CAG	GGT	GTC	CAG

VIII

AAA ATG AAG AAC ACT GTC ACT AGC ACC ATG CTA GGC GTG TTC CGG GAA GAC CCA AAG ACT CCG GAG GAG TTC CTC ACA CTC ATC AAG  
211 Lys Met Asn Ser Lys Thr Val Thr Ser Thr Met Leu Gly Val Phe Arg Glu Asp Pro Lys Thr Arg Glu Phe Leu Thr Leu Ile Arg

241 Ser \*\*\*  
 A6C TGA AC TTC C6T GTG CAG CCCC G6T TGC AGA CCCC C6C TGA G6C AGC C6T ATC TGT CTC GAT TGT GCA TTT CCA G6T TCC CAG TTT GGT ATA CTT TGT CAC CAT TAT TTT CTC CAC CAT 837

GAATGATATTAAATATTTATTATAGAGATGTCAAATAAAGGTGATCACTTAAAAAA

## 第 1 1 図

蛋白質	残基番号	配列
GTP シクロヒドロラーゼ I	(77-96)	PQRQGLLKT PWR-AATAMQFF
ジヒドロホレート E. coli	(14-31)	IGMENAM--PWN-LPADLAWC
還元酵素 S. faecium	(14-31)	IGKDGGL--PWR-LFNDMRFF
S. cerevisiae	(21-38)	IGFRGGL--PWR-LPSEMKYF
L. major	(39-56)	IGDGES--PWR-VPEDMTFF
マウス	(16-34)	IGKNGDL--PWPPLRNEFKYF
ヒト	(16-34)	IGKNGDL--PWPPLRNEFRYF

## 手続補正書（方式）

平成2年11月3日

特許庁長官 植松 敏 殿

## 1. 事件の表示

平成2年特許願第193359号

## 2. 発明の名称

テトラヒドロピオブテリンの製法およびそれに  
用いる酵素

## 3. 補正をする者

事件との関係 出願人

住所

名称 (190) サントリー株式会社

## 4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビル 206区

電話 (270)-6641~6

氏名 (2770) 井理士 湯 浅 恭

## 5. 補正命令の日付 平成2年10月30日（発送日）

## 6. 補正の対象

明細書の（図面の簡単な説明）の欄

2.11.14

## 7. 補正の内容

(1) 明細書第64頁第3行～第5行の「第5図  
Aは……SPRの至適pHを示すグラフである。」  
を「第5図は、GCH、PTPSおよびSPRの  
至適pHを示すグラフである。」と補正する。